

- [9] Fox, G. M. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, **263**:18452-18458.
- [10] Abraham, J. A. et al., 1986, *EMBO, J.*, **5**:2523-2528.
- [11] Rogeli, S. et al., 1988, *Nature*, **331**:173-175.
- [12] Baskin, P. et al., 1989, *Biochemistry*, **28**:1737-1743.
- [13] Saksela, O. et al., 1990, *J. Cell. Biol.*, **110**:767-775.
- [14] Shing, Y. et al., 1984, *Science*, **223**:1296-1298.
- [15] Yayojn, A. et al., 1991, *Cell*, **64**:841-848.
- [16] Burgess, W. H. et al., 1989, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**:575-606.
- [17] Feige, J. J. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**:3174-3178.
- [18] Gospodarowicz, D. et al., 1987, *Endocr. Rev.*, **8**:95-114.
- [19] Folkman, J. et al., 1987, *Science*, **235**:442-447.
- [20] Davidson, J. M. et al., 1985, *J. Cell. Biol.*, **100**:1219-1227.
- [21] Kimelman, D. et al., 1988, *Science*, **242**:1053-1056.
- [22] Amaya, E. et al., 1991, *Cell*, **66**:257-270.
- [23] Kalchein, C and Neufeld, G., 1990, *Development*, **109**:203-215.
- [24] McNeil, P. L. et al., 1989, *J. Cell. Biol.*, **109**:811-822.
- [25] Sakaguchi, M. et al., 1988, *FEBS Lett.*, **233**:163-166.
- [26] Paolo, M. et al., 1991, *J. Cell. Biol.*, **47**:201-207.
- [27] Paolo, M. et al., 1992, *J. Cell. Physiol.*, **151**:81-93.
- [28] Folkman, J. et al., 1992, In *Cancer Medicine*. 3rd Ed.
- [29] Frank, C. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, **269**:28243-28248.
- [30] 王楠, 徐永华, 1998, *实验生物学报*, **31**(1):41-48.

心肌细胞的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换

刘恭鑫 杨英珍

(上海医科大学中山医院 上海市心血管病研究所卫生部病毒性心脏病重点实验室 上海 200032)

心肌细胞去极化, Ca^{2+} 跨膜内流; 肌浆网(SR)释放 Ca^{2+} , 触发细胞收缩; 随后 Ca^{2+} 被转运入肌浆网或运出胞外。如此周而复始, 使心肌细胞兴奋收缩偶联得以不断进行。在此过程中 Ca^{2+} 运入和运出胞浆是由细胞膜上的电压依赖性钙通道(VDCC)、肌浆网上的受体操纵性钙通道、细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体(NCE)及细胞膜与浆膜上的钙泵等所调控^[1]。其中细胞质膜上的 NCE 对细胞内钙平衡的维持起重要作用, 近年来对这一离子交换系统进行了较为广泛的研究, 本文就心肌细胞 NCE 的研究进展作一简要概述。

一、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体的特性

NCE 是一种双向转运载体。 Na^+ 运入细胞

伴随着 Ca^{2+} 运出细胞; Ca^{2+} 运入细胞伴随着 Na^+ 运出细胞。心肌细胞的 NCE 于 1968 年为 Baker 和 Seitz^[2] 等所认识, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 转运化学计量比是 $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ ^[3]。其转运方向由跨膜电化学势能所决定, 用方程式 $A = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}} - E_m$ 表示, 其中 A 表示跨膜的总电化学势能, E_{Na} 和 E_{Ca} 分别是 Na^+ 和 Ca^{2+} 的平衡电位, E_m 是膜电位。若交换处于平衡状态时, $A = 0$, 此时的 E_m 称 E_q ; 由上方程式得 $E_q = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}}$ 。 E_q 即逆转电位, 在此电位时 NCE 将改变转运方向。心肌细胞的 E_m 为 -90mV, E_q 约为 -40mV, 因而静息时 NCE 呈正向转运模式(Na^+ -in/ Ca^{2+} -out), 即静息时 NCE 起外运 Ca^{2+} 的作

本文撰写曾蒙中国科学院上海细胞生物学研究所研究员顾全保先生指导, 谨表深切谢意。

用^[4]。有实验证实静息状态下漏入细胞内的 Ca^{2+} 75% 由 NCE 运出, 剩余由钙泵运出胞外或运入 SR。细胞去极化时 Na^+ 快速内流使膜电位逆转, 去极化末期与复极化早期, 膜电位较 E_q 为正, 因此 NCE 的转运方向与静息时相反而成为逆向转运模式 (Na^+ -out/ Ca^{2+} -in)。细胞内 Na^+ 增多也使逆向转运增强。由 NCE 和 VDCC 运入细胞的 Ca^{2+} 共同触发 SR 释放 Ca^{2+} 。复极化后期 E_m 较 E_q 为负时 NCE 又恢复了正向转运模式, 将电兴奋时转运入胞浆内的 Ca^{2+} 转出细胞, 并与 SR 上的钙泵一起降低胞浆内 Ca^{2+} , 促使细胞舒张。

二、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体的功能

NCE 不仅在外运 Ca^{2+} , 降低细胞内的 Ca^{2+} 浓度, 促使细胞舒张过程中起重要作用^[5]; 而且在增加细胞内的 Ca^{2+} 浓度, 触发收缩活动过程中也同样起重要作用。发育早期 SR 尚未成熟, 由 SR 释放的 Ca^{2+} 触发收缩活动受到一定的限制^[6]; 此时由细胞外跨膜运入的 Ca^{2+} 在触发收缩活动中起关键作用。然而, VDCC 也和 SR 一样, 胎儿期和新生期细胞上的 VDCC 表达不足^[7]。能抑制成人心肌收缩的 Ca^{2+} 拮抗剂几乎不影响新生期心肌细胞的收缩^[8], 说明新生期由 VDCC 跨膜转运入细胞内的 Ca^{2+} 在引起心肌细胞收缩过程中也不起主要作用。Artman^[9]发现新生期兔心肌细胞的 NCE 较成年兔多, 出生后一个月才降到成年水平, 且 NCE 的 mRNA 的表达水平也有类似的改变。发育早期兔的心肌收缩不依赖于 VDCC, 而主要依赖于 NCE^[10]。由 NCE 转入细胞内的 Ca^{2+} 占总跨膜内运 Ca^{2+} 的 80%。因而发育早期 NCE 在兴奋收缩偶联中起关键作用。处于发育成熟阶段的动物, 随着 VDCC 的发育成熟, 经 NCE 跨膜内运的 Ca^{2+} 退居次要地位。生理情况下由 NCE 跨膜内运的 Ca^{2+} 直接触发细胞收缩活动的作用是非常微小的^[11]。尽管认为

NCE 可通过触发 SR 释放 Ca^{2+} 而引起收缩^[11], 但其作用远小于 L 型 VDCC, 此时 NCE 的主要功能是外运 Ca^{2+} 促使细胞舒张, 内运 Ca^{2+} 为充载 SR 提供 Ca^{2+} 基础。

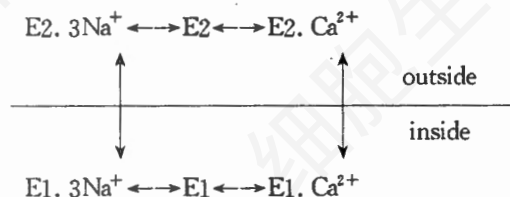
三、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体的分子结构

NCE 广泛存在于机体的许多组织, 其中分布最多的是心脏^[12]、脑和肾脏。纯化的 NCE 经 SDS-PAGE 电泳显示三条带, 分子量分别是 160、120、70KD^[13]。70KD 由 120KD 降解而来, 而 120KD 与 160KD 系同一分子由于氧化形式不同而与不同数量的 SDS 结合, 其迁移率不同所致。1990 年 Nicoll^[14]从狗心脏中克隆出 NCE 的 DNA, 长约 7KB, 编码区位于 5' 端约 3KB 范围内, 对应于 970 个氨基酸, 分子量约 108KD; 在其 N 末端有一个分裂引导肽, 除此之外, NCE 尚有 11 个疏水跨膜片段组成, 在第 V 与第 VI 个片段之间有一个由 520 个氨基酸残基组成的亲水环, 其位于细胞膜的内表面。自 Nicoll 从狗心脏中克隆出 NCE 以后, 牛心、人心、鼠心、兔肾、脑等组织的 NCE 的 cDNA 也先后被克隆出来。将携带有 NCE 的 cDNA 质粒分别注射入 COS-cell、HEK293-cell^[12] 等细胞中均能表达有功能活性的 NCE。多数 NCE 的 cDNA 是由同一基因编码, 在不同的组织或种属中剪切不同。这种剪切多发生在浆膜面游离的亲水环结构中^[15]。据推测由不同的外显子组合可产生 32 种剪接体^[16], 目前已发现 8 种 NCE 剪接结构^[17]。1994 年 Li^[18]从鼠脑组织克隆出另一种类型的 NCE (称 NCE2), 与前述的 NCE (称 NCE1) 在核苷酸和氨基酸序列上分别有 61% 和 65% 的同源性。1996 年 Nicoll 又从脑组织中克隆出 NCE3^[19], 与 NCE1 和 NCE2 在氨基酸序列上分别有 73% 和 75% 的同源性, NCE3 主要存在于骨骼肌。至此, 已发现三种 NCE 基因。人 NCE1 基因位于 2 号染色体上, NCE2 位于 14 号染色体上。NCE3 的染色

体位置尚不清楚。

四、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体的调节

NCE 转运离子的模式目前支持较多的是连续性两步模式^[20], 如图所示:



E1 和 E2 是 NCE 的两种不同构型。E1 是离子结合位点面向细胞内的构型。E2 是离子结合位点面向细胞外的构型。其运转方向取决于膜电位和逆转电位。当膜电位负于逆转电位时, NCE 呈正向运转, 当膜电位正于逆转电位时, NCE 呈逆向转运。细胞外的 Ca^{2+} 增加使逆转电位向负电位方向偏移, 增加正电位时的外向电流。细胞内的 Ca^{2+} 增加使逆转电位向正电位方向偏移, 增加负电位时的内向电流。细胞内的 Ca^{2+} 不仅影响逆转电位还促使载体由抑制状态进入激活状态, 激活阈浓度为 10nmol/L , 最大激活浓度为 50nmol/L , 因此细胞内生理浓度的 Ca^{2+} 是处在其最适的激活范围^[21]。钙离子对 NCE 的调节与 Ca^{2+} 和 NCE 亲水环结构中的 Ca^{2+} 结合区域结合有关^[22]。细胞外和细胞内的 Na^+ 对逆转电位的作用与细胞外和细胞内的 Ca^{2+} 的作用相反。细胞内的 Na^+ 也可促进 NCE 由抑制状态进入激活状态, 然而这种作用具有时间依赖性; 其对 NCE 激活后于 1 秒内产生 Na^+ 依赖性失活^[23]。 Na^+ 对 NCE 的激活依赖于细胞内的 Ca^{2+} 存在, 细胞内的 Ca^{2+} 可降低 NCE 的 Na^+ 依赖性失活。除了 NCE 的底物对 NCE 起调节作用外, 体内的 H^+ 、ATP、cAMP、cGMP 及一些激素和酶也对 NCE 起调节作用。 H^+ 和 Na^+ 、 Ca^{2+} 与 NCE 竞争性结合, 在 pH 小于 6 的酸性环境下 NCE 的活性被抑制, 在 pH 大于 7.4 的碱性环境下 NCE 的活

性增强^[24]。pH 对 NCE 的影响在细胞内低钙的情况下更为明显。尽管 NCE 转运是一种易化转运, 但 ATP 可增强外向电流, 这种作用不被 cAMP、蛋白激酶抑制剂所抑制, 可能是 ATP 与 NCE 相互作用而抑制 Na^+ 依赖性失活或促使低浓度的 Ca^{2+} 对 NCE 的激活作用^[25]。 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 的活性对外向性电流的影响已早为人所知。应用 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 抑制剂洋地黄可使细胞内的 Na^+ 增多, 从而促进外向性电流, 增加细胞内的 Ca^{2+} 浓度。这是洋地黄增强心肌收缩作用的主要机理。甲状腺素、糖皮质激素、肾上腺素和血管加压素等也都影响着 NCE 的活性。

五、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体的抑制剂

早期有关 NCE 抑制剂的探讨是在一些无机离子和有确定心血管药理效应的化合物以及其它离子通道或转运载体的抑制剂中寻找。一些重金属离子如 La^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 等可完全阻断 NCE 的活性^[26]。安力农 (Amiloride) 及其衍生物、乙醇、三环类抗抑郁药、钙调素拮抗剂、牛磺酸和 D600 等可部分抑制 NCE 的活性, 然而上述物质均无特异性。除对 NCE 有抑制效应外, 对依赖于 Na^+ 的转运系统和电压依赖性 Na^+ 、 Ca^{2+} 通道均有抑制作用。近年来合成的 Isothiourea 衍生物 (NO. 7943) 被认为是一种对 NCE 有选择作用的抑制剂^[27]。 $1.2-2.4\mu\text{mol/L}$ 的 NO. 7943 可抑制心肌细胞、血管平滑肌细胞和转染的成纤维细胞的 NCE 的活性, 而 $10\mu\text{mol/L}$ 的 NO. 7943 却不抑制其它转运系统。NO. 7943 对 NCE 介导的 Ca^{2+} 内流的抑制作用大于对 Ca^{2+} 外流的抑制作用, 提示 NCE 正向转运和逆向转运具有不同的特性。由于 NO. 7943 具有选择性抑制作用, 因而可能作为一种阻断剂在诸如缺血/再灌注和缺氧/复氧等病理情况下选择性阻断由 NCE 介导的细胞内 Ca^{2+} 增多。如前所述在 NCE 的结构中, 质

膜内表面有一个大亲水环,其中一段由 20 个氨基酸残基构成,被称为钙调素结合自主抑制区,其具有与钙调素相结合的特性。根据此区的结构合成了一系列蛋白肽对 NCE 具有选择性抑制作用。最早合成的是 XIP^[28]。其以非竞争性方式抑制 NCE 的活性,如同 NO. 7943 一样其对 NCE 介导的 Ca^{2+} 内流的抑制作用大于对 Ca^{2+} 外流的抑制作用。继 XIP 之后又先后合成了一种四肽 FMRFa^[29] 和环六肽 FRCRCFa^[30],均显示对 NCE 具有特异性抑制作用。FRCRCFa 对 NCE 的抑制作用不同于 XIP,其对 Ca^{2+} 外流的抑制作用大于对 Ca^{2+} 内流的抑制作用。XIP、FMRFa 和 FRCRCFa 由于其仅在细胞内发生作用,而且可能和其他钙调素蛋白相结合,因而目前尚不能应用于生理学实验。

六、病理情况下 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体的改变

NCE 是参与维持细胞内钙平衡的四个主要因素之一。许多疾病中 NCE 可有原发性或继发性的改变。动物实验中结扎主动脉造成急性左心室肥厚,术后 7 天心肌细胞上的 NCE 活性增加了 53%。1-4 小时即可出现 NCE 的 mRNA 表达增多,48 小时可出现 NCE 蛋白质合成增多^[31]。叙利亚地鼠(Syrian hamster)是一种遗传性肥厚性心肌病易患鼠,发病晚期心肌细胞的钙泵和 L-型 VDCC 均受损,但其 NCE 的活性却是增强的^[32],这和 Studer^[33]等报道的一组人终末期心脏病患者的 NCE 活性增高是一致的。Reinecke^[34]报道一组 13 例扩张性心肌病、11 例冠心病患者中,其 NCE 的 mRNA 表达分别增加了 55%、41%;而肌浆网钙泵的 mRNA 表达分别下降了 50% 和 45%。可见,不论发病原因急缓以及最初发病原因如何,其 NCE 总是增多的。显然增多的 NCE 可代偿或弥补钙泵、L-型 VDCC 功能的相对或绝对不足,但另一方面可能是病理情况下产生心律失常的原因^[35]。

摘 要

心肌细胞的正常功能依赖于细胞内的钙离子平衡,而心肌细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体(NCE)是调节细胞内钙离子平衡的主要途径之一。NCE 是一种双向转运载体,既可将细胞内的 Ca^{2+} 转运到细胞外,又可将细胞外的 Ca^{2+} 转运到细胞内,因而在心肌舒张和收缩过程中具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Barry WH., 1993, *Circulation*, **87**:1806-1815.
- [2] Baker PF., et al., 1968, *J Physiol.*, **195**:451-470.
- [3] Reeves JP., et al., 1984, *J Bio Chem.*, **259**:7733-7739.
- [4] Kimura J., et al., 1986, *Nature*, **319**:596-599.
- [5] Cannel MB., et al., 1991, *Ann NY Acad Sci.*, **639**:428-443.
- [6] Artman M., et al., 1992, *Cardiovasc Res.*, **26**:3-13.
- [7] Wetzel GT., et al., 1993, *Pediatr Res.*, **30**:89-94.
- [8] Wetzel GT., et al., 1995, *Am J Physiol.*, **268**:H1725-1733.
- [9] Artman M., et al., 1995, *Am J Physiol.*, **268**:H1714-1722.
- [10] Nuss HB., et al., 1992, *Am J Physiol.*, **263**:H1161-1169.
- [11] Levi AJ., et al., 1994, *Am J Physiol.*, **266**:H1422-1433.
- [12] Kofuji P., et al., 1992, *Am J Physiol.*, **263**:C1245-1249.
- [13] Philipson KD., et al., 1988, *Biochem Biophys Acta.*, **945**:298-306.
- [14] Nicoll DA., et al., 1990, *Science*, **250**:562-565.
- [15] Lee SL., et al., 1994, *J Bio Chem.*, **269**:14849-14852.
- [16] Kofuji P., et al., 1994, *J Biol Chem.*, **269**:5145-5149.
- [17] Reilly KF., et al., 1997, *Ann NY Acad Sci.*, **779**:129-13116.
- [18] Li J., et al., 1994, *J Bio Chem.*, **269**:17434-17439.

- [19] Nicoll D., et al., 1996, *J Biol Chem.*, **271**:24914-24921.
- [20] Hilgeman DW., et al., 1991, *Ann NY Acad Sci.*, **639**:126-139.
- [21] Hilgeman DW., et al., 1992, *J Gen Physiol.*, **100**:933-961.
- [22] Levitsky DO., et al., 1994, *J Biol Chem.*, **269**:22847-22852.
- [23] Hilgeman DW., et al., 1992, *J Gen Physiol.*, **100**:905-932.
- [24] Doering AE., et al., 1993, *J Physiol.*, **466**:481-99.
- [25] Collins A., et al., 1992, *J Physiol.*, **454**:27-51.
- [26] Kimura J., et al., 1987, *J Physiol.*, **384**:199-222.
- [27] Watano T., et al., 1996, *Br J Pharmacol.*, **119**:555-563.
- [28] Li Z., et al., 1991, *J Biol Chem.*, **266**:1014-1020.
- [29] Khananshvili D., et al., 1993, *J Biol Chem.*, **268**:200-205.
- [30] Khananshvili D., et al., 1995, *J Biol Chem.*, **270**:16182-16188.
- [31] Kent RL., et al., 1993, *Am J Physiol.*, **265**:1024-1029.
- [32] Hatem SN., et al., 1994, *Circ Res.*, **74**:253-261.
- [33] Studer R., et al., 1994, *Circ Res.*, **75**:443-453.
- [34] Reinecke H., et al., 1996, *Cardiovasc Res.*, **31**:48-54.
- [35] Janlier NC., et al., 1996, *Cardiovasc Res.*, **32**:69-84.

细胞核钙信号研究进展

孙 益

(浙江大学生物科学与技术系 杭州 310027)

钙离子作为细胞内重要的第二信使,在许多生理过程中发挥着关键的作用。最近几年来,随着钙检测技术的不断发展和改进,细胞核钙的研究取得了许多重要的进展。本文从细胞核钙运输、核钙对核与胞质间物质运输的调节,以及核钙在基因表达、有丝分裂和细胞凋亡中的作用等几个方面综述了核钙研究的最新进展。

一、细胞核钙运输途径

核被膜(nuclear envelope)由外核膜、内核膜和双层核膜间的核周隙组成。核被膜和核孔复合体将细胞分为核与细胞质两个相对独立又相互联系的功能区。用快速冷冻方法发现,在老鼠肝细胞核内的钙总量仅为整个细胞钙总量的1%,核钙含量(0.8mmol/g干重)仅为整个细胞平均钙含量(3.4mmol/g干重)的1/4^[1]。而在神经元内核钙含量与整个细胞平均钙含量基本相等^[2]。由于核孔复合体中央具有功能直径

达9nm的亲水性通道,一般认为离子、水溶性分子可在核与胞质间自由扩散。所以早先一直认为核内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_n$)与胞质游离钙浓度($[Ca^{2+}]_c$)是相等的。随着钙敏感荧光指示剂的发展以及数字图象技术和激光共聚焦显微镜技术的应用,人们发现核内外游离钙浓度并不完全相等。交感神经元在静息时 $[Ca^{2+}]_n$ 与 $[Ca^{2+}]_c$ 相等,受刺激后 $[Ca^{2+}]_n$ 的升高速度和幅度都大于 $[Ca^{2+}]_c$ ^[3]。肝细胞在静息条件下 $[Ca^{2+}]_c$ (210nM)为 $[Ca^{2+}]_n$ (128nM)的1.6倍,在表皮生长因子刺激后,两者都有2-3倍的增加,但 $[Ca^{2+}]_n$ 仍然低于 $[Ca^{2+}]_c$ ^[4]。而成纤维细胞(BALB/C3T3)在静息时和受刺激后, $[Ca^{2+}]_n$ 与 $[Ca^{2+}]_c$ 基本相等^[5]。虽然在不同种类的细胞检测到不同的结果,但有一点可以肯定,即 $[Ca^{2+}]_n$ 并不是被动的随着 $[Ca^{2+}]_c$ 的变化而变化。进一步研究表明,核本身具有独立调节 $[Ca^{2+}]_n$ 的钙运输途径。